

Ribosomal DNA ITS 유전자를 이용한 왕지렁이 (빈모강: 지렁이과) 그룹의 계통분류

홍 용 · Samuel W. James¹ · 황의욱² · 이보은³ · 박순철³ · 김태홍^{4,*}

상주대학교 농업과학연구소, ¹캔자스대학교 자연사박물관, ²경북대학교 생물교육과,
³중앙대학교 생명과학과, ⁴전북대학교 생물자원과학부

Molecular Phylogeny of the *Amyntas*-complex (Oligochaeta: Megascolecidae) Inferred from ITS Nucleotide Sequences

Yong Hong, Samuel W. James¹, Ui Wook Hwang², Bo Eun Lee³,
Soon Cheol Park³ and Tae Heung Kim^{4,*}

Institute of Agricultural Science, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea

¹*Kansas University Natural History Museum and Biodiversity Research Center, USA*

²*Department of Biology, Teachers College, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea*

³*Life Science, College of Natural Science, Chung Ang University, Seoul 156-756, Korea*

⁴*Faculty of Biological Resources Science, College of Agriculture and Life Sciences,
Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea*

Abstract – Phylogeny of the species mainly from the genus *Amyntas* in family Megascolecidae was inferred at the molecular level using ITS regions in rDNA. With 26 species of earthworms from 10 genera in 2 families, a stretch comprising the 3'-end of the 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 5'end of 28S rRNA was amplified by applying the primers ITS-1, ITS-2. Phylogenetic analyses of nucleotide sequences with a help of MP, NJ, and QP yielded 5 groups similarly. Genus *Amyntas* was separated largely into two groups, Korean and Philippine origins. Species grouped into the 1st were *Amyntas jirensis*, *A. agrestis*, *A. gucheonensis*, *A. sopaikensis*, *A. bubonis*, *A. multimaculatus*, *A. koreanus*, *A. dageletensis*, *A. heteropodus*, *A. odaesanensis*, *Pontoscolex* sp., *Pheretima* sp. 1, and *Dendropheretima banahawensis*. *Amyntas halconensis*, *A. isarogensis*, *A. mindrooensis*, *Pithmera* sp. 2, *Pithmera* sp. 1, and *Pleionogaster* sp. clustered into one clade forming the 2nd group. *Polypheretima* sp. 1 and *polypheretima* sp. 2 stayed closely together representing a separate monophyletic status, forming the 3rd group, apart from species in other genera. *Archipheretima* sp. falls into the 4th group. Distinct morphological characteristics from *Archipheretima* also coincides with its branching away from others in the previously reported molecular analyses. Similar to *Perionyx excavatus* that has been selected as an outgroup, *Aporrectodea tuberculata* also showed a long branch in the phylogram, but it differed from other 24 species included in the analyses. Unlike others, for example, its habitat is very closely related to that of man.

Key words : earthworm, *Amyntas*, Megascolecidae, Oligochaeta, ITS, rDNA

*Corresponding author: Kim, Tae-Heung, Tel. 063-270-2526,
Fax. 063-270-2531, E-mail. bandy@chonbuk.ac.kr

서 론

지렁이과 (family Megascolecidae)의 왕지렁이 그룹 (*Pheretima*-complex)속은 보고된 종이 1,000여종에 달하는 커다란 분류군으로, 육상지렁이 (Oligochaeta) 중에서 분류학적으로 많은 논란이 되고 있는 대표적인 그룹이다. 최근에는 동아시아 지역을 중심으로 많은 종들이 새로이 추가되고 있다. Sims and Easton (1972)은 분류학적으로 중요한 형질인 body shape, intestinal caecum, oesophageal pouches, clitellum location, copulatory pouches, nephrida 등을 이용하여 *Pheretima* 그룹을 다음과 같은 세분화된 그룹으로 분리하였다. 즉 *Archipheretima*, *Pithemera*, *Ephemitra*, *Metapheretima*, *Planapheretima*, *Amynthas*, *Metaphire*, *Pheretima* 등이다. 그 후 Easton (1979)에 의해서 *Ephemitra*와 *Metaphere-tima*를 *Metapheretima*와 *Polypheretima*로 재정리하고 1982년에는 *Amynthas* 속을 *Begemius*와 *Amynthas*로 다시 나누었다. 본 논문의 제2 저자인 James (2005a)는 필리핀지역에서 채집한 종들을 근거로 *Dendropheretima*, *Isarogoscolex* 등 2개의 신속 그룹을 추가한 바 있다. 따라서 지금까지 지렁이과의 *Pheretima*-complex에 속하는 그룹은 현재 11개의 속으로 정리되어 있는 상태이다. 본 논문의 주요 분석대상인 왕지렁이속 (genus *Amynthas*)은 지렁이과에 속하는 그룹 중 가장 큰 그룹으로 500종 이상을 포함하고 있다 (Sims and Easton 1972). 하지만 지금까지 한국에서 보고된 지렁이과의 종들은 처음에는 모두 *Pheretima* 속에 속하는 종으로 기재되었다 (Kobayashi 1934, 1936, 1938; Song and Paik 1969, 1970a, b, 1971, 1973). 한국에서 기재된 *Pheretima*에 속하는 종들을 최근의 분류 체계인 Sims and Easton 방법에 따라서 다시 분류할 때 *Amynthas*, *Metaphire* 및 *Pithemera* 등으로 구분할 수 있다.

현재 한국산 지렁이는 3과 9속 101종이 보고되었다 (Kobayashi 1938; Song and Paik 1973; Hong 2002; Hong and James 2001a,b; Hong and Kim 2002a,b). 염주위지렁이과 (family Moniligastridae)의 9종과 뉘시지렁이과 (family Lumbricidae)의 12종을 제외한 전체의 79.2%가 지렁이과의 *Pheretima*-complex에 속하는 종들이다.

최근 생물의 진화적 유연관계를 밝히는 연구에 DNA 분자를 이용한 다양한 방법들이 적용되고 있다 (Banks *et al.* 1993; Anderson and Adlard 1994). 하지만 지렁이 분류군에 대한 분자생물학적 수준의 연구는 활발하지 못하고, 상위 분류군인 문 (Phylum) 등의 계통관계 실험에 있어 단지 환형동물문 (Phylum Annelida)의 1종으로 인용되고 있는 실정이다. 최근 DNA를 이용하여 지렁이과

사이의 계통분류 (Jamieson *et al.* 2002), rDNA와 mtDNA를 이용하여 속과 종사이의 유연관계를 해석하려는 시도가 이루어지고 있다 (James 2005b; Chang *et al.* 2005; Chang *et al.* 2007).

본 연구에서 사용한 유전자는 rDNA의 ITS이다. 이 유전자는 상위 분류군이 아니라 속 내, 종 또는 개체군간 유연 정도를 알아볼 때 주로 사용되는 유전자로써 식물에서 많이 이용하고 있으며, 최근에는 동물 그룹에서도 그 이용이 증가되고 있다 (Baldwin *et al.* 1993; Hwang and Kim 1999; Yang *et al.* 1999). 동물계의 종 식별용 유전자로 주로 사용되는 부위는 ITS와 CO1, 그리고 cyto b를 많이 이용하고 있으나, 본 연구에서는 ITS 유전자 부위를 사용하여 연구자들에 의해서 분류학적으로 논란이 되고 있는 지렁이과내 왕지렁이속 그룹에 대해 분자생물학적인 방법을 이용하여 종간, 속간 유연관계 및 지리적 분포와의 관계를 알아보고자 하였다. 또한 국내에서 우점종인 *Amynthas* 속의 종들은 동남아시아에서 주로 채집되는 그룹과는 다른 점에 착안하여 *Amynthas*를 중심으로 한 *Pheretima*-complex 그룹의 분류학적 난점에 도움이 되고자 본 연구를 수행하였다. 본 논문에서 취급한 한국과 필리핀을 제외한 동남아시아의 다른 지역, 즉 베트남, 중국, 라오스 등의 *Pheretima*-complex 그룹의 다른 종들을 추가하여, 차후 이 분류 그룹에 대한 계통을 알아보는데 도움이 되고자 한다.

재료 및 방법

1. 채집 및 표본선택

채집은 지렁이가 많이 서식하고 있는 국내외 삼림에서 식생, 토양형태, 토양 내의 위치 등을 고려하여 지렁이가 성적으로 성숙하고 활동이 가장 활발한 시기인 7월에서 10월 사이에 실시하였다. 동정 및 분류는 Sims and Easton (1972), Easton (1979, 1982)의 기재를 참고하였다. 국내에 기재된 80종의 왕지렁이속 가운데는 1930년대와 60년대에 기재되고, 다시 채집되지 않는 종들이 대부분이다. 본 논문에서는 최근에 채집이 빈번하게 되는 종들과, 우리나라 주변국가 중 표본을 용이하게 확보할 수 있는 필리핀을 선택하였다. 필리핀은 현재 국내에는 단 1종도 보고되지 않은 *Pheretima* 속에 포함하는 종들이 대부분으로 (James 2004) 왕지렁이속 (*Amynthas*)으로 9종만이 보고되어 있다 (Hong and James 2004). 또한 필리핀은 중국이나 베트남 등지와는 달리 *Pithemera*, *Metapheretima*, *Polypheretimatima* 등의 개체들이 다양하게 출현하는 지역이고, 최근 신속으로 기재된 *Dendro-*

Table 1. The species list that belongs to the *Pheretima*-complex

Species	Locality	Accession No.
<i>Archipheretima</i> sp.	Akbab, Nueva Vizcaya, Philippines	
<i>Amynthas koreanus</i>	Mt. Gariwang, Korea	
<i>Amynthas jiriensis</i>	Mt. Choowalsan, Korea	
<i>Amynthas gucheonensis</i>	Mt. Baikwansan, Korea	
<i>Amynthas agrestis</i>	Mt. Paikam, Korea	
<i>Amynthas bubonis</i>	Mt. Minjoogi, Korea	
<i>Amynthas multimaculatus</i>	Mt. Minjoogi, Korea	
<i>Amynthas sapaikensis</i>	Mt. Baekdeog, Korea	
<i>Amynthas odaesanensis</i>	Mt. Baekdeog, Korea	
<i>Amynthas heteropodus</i>	Seoguipo, Jeju-do, Korea	
<i>Amynthas dageletensis</i>	Albong, Ullung-do, Korea	
<i>Amynthas isarogensis</i>	Mt. Isarog, Camarines Sur, Philippines	
<i>Amynthas halconensis</i>	Mt. Halcon, Mindoro Oriental, Philippines	
<i>Amynthas mindoroensis</i>	Mt. Halcon, Mindoro Oriental, Philippines	
<i>Dendropheretima banahawaensis</i>	Mt. Banahaw, Batangas, Philippines	
<i>Dendropheretima bicoloris</i>	Mt. Isarog, Camarines Sur, Philippines	
<i>Pheretima</i> sp. 1	Riparian forest, Mountain, Philippines	
<i>Pheretima</i> sp. 2	Mindoro, Philippines	
<i>Pithemera</i> sp. 1	Akbab, Nueva Vizcaya, Philippines	
<i>Pithemera</i> sp. 2	Mt. Amuyao, Mountain, Philippines	
<i>Pleionogaster</i> sp.	Camarines Sur, Philippines	
<i>Polypheretima</i> sp. 1	Akbab, Nueva Vizcaya, Philippines	
<i>Polypheretima</i> sp.	Akbab, Nueva Vizcaya, Philippines	
<i>Pontoscolex</i> sp.	Bulsan NP, Philippines	
<i>Perionyx excavatus</i>	Jeonbuk Univ., Korea	
<i>Aporrectodea tuberculata</i>	California worm farm, USA	

*pheretima*가 서식하는 지역이다. 또한 본 연구에서는 한국산 왕지렁이와 비교하기 위하여 최근 채집한 필리핀산 왕지렁이 3종을 포함하였다. 빈모강 내에서 지렁이과의 *Pheretima*-complex에 대한 계통상의 위치를 추론하기 위한 분석에서 사용된 분류군은 Table 1과 같다.

2. PCR 및 DNA sequencing

Genomic DNA 추출은 kit (Qiagen)를 사용하였으며, 추출한 genomic DNA로부터 ITS 염기서열을 분석하기 위하여 지렁이 genomic DNA를 주형으로 한 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 30초, 63°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 35 cycles를 수행하였다. 반응에

사용한 ITS primer는 다음과 같다. ITS-1 CGC CCG TCG CTA CTA CCG ATT, ITS-2 GTC CCG AAC ACC ACA GTT CCC.

PCR 산물을 1.0% agarose gel에서 80 V로 전개하여 그 band 양상을 확인하였으며, HiYield Gel/PCR DNA fragments Extraction Kit (RBC)를 이용하여 PCR 산물을 추출하였다. 추출한 plasmid의 염기서열을 각각 forward (T7), reverse (SP6) primer로 분석하여 ITS 염기서열을 확인하였다.

3. 데이터 분석

분류군들로부터 얻어진 염기서열을 Clustal X program을 사용하여 정렬하였다. Sequence alignment는 DNA 염기서열을 기초로 한 분자계통 연구에서 편중되지 않은 객관적인 계통수를 얻는데 있어 중요한 요소 중 하나이므로 (Castresana 2000) Clustal X를 이용해 aligned된 sequence file을 최근에 고안된 G-Block (http://www.embl-heidelberg.de/~castresa/Gblocks/Documentation/Gblocks_documentation.html) program을 이용하여 신뢰성 있는 realignment를 수행하고 이를 바탕으로 PAUP* (Swofford 2002)과 Tree-Puzzle 5.0 program을 이용하여 계통분석을 실시하였다.

Maximum Parsimony 분석은 PAUP*에서 Heuristic search를 1,000회 반복 실행하였고, Neighbor Joining 분석 또한 PAUP*에서 실행하였으며, GTR (general time-reversible) model를 이용하여 1,000회 반복하였다. Quartet Puzzling은 Tree-Puzzle에서 실행하여 HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) model로 계통분석을 하였다.

4. 계통분석을 위한 선택된 유전자

본 연구에서는 2과 10속에서 26종의 18S rRNA gene의 3'말단부터 ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene 5'의 일부분을 포함하는 영역까지 총 DNA 염기서열 1,413개 중에서 G-Block를 실행하여 뽑힌 924개의 염기서열을 가지고 이들 사이의 계통 유연관계를 분석하였다. 이 염기서열 가운데에는 primer부분인 18S (152 bp), 28S (164 bp)를 포함하였으며, ITS2 사이의 5.8S (146 bp)도 포함하여 분석하였다.

결 과

확보된 염기서열을 바탕으로 Clustal X, MEGA, PAUP* 등의 분석 프로그램을 이용하여 계통적 유연관

계를 밝혔다. 2과 10속 26종에 대한 ITS 전체 염기서열을 구했으며, 정렬된 염기서열을 바탕으로 종간 계통 유연관계를 확인하기 위하여 MP (Maximum Parsimony), NJ (Neighbor Joining), QP (Quartet Puzzling)로 계통도를 작성하였다 (Fig. 1). 계통도에 나타난 특징적 결과를 살펴보면 다음과 같다.

염기서열이 확보된 Megascolecidae (지렁이과)의 국내의 26종에 대한 계통분석은 위 3개의 알고리즘 모두 동일한 5개의 그룹으로 나뉘는 것을 확인하였다. 따라서 여기에서는 MP를 중심으로 기술하였다. 또한 *Amynthas* 속은 크게 한국산 그룹과 필리핀산 그룹으로 구분되었다. 이는 ITS 유전자가 속간의 차이를 보여주는 것보다 지리적인 분포에 더 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 이에 대한 선행 연구 결과는 아직 발표된 바 없기 때문에 본 연구에서는 비교할 수 없었다.

첫 번째 그룹은 *A. jirensis*, *A. agrestis*, *A. gucheonensis*, *A. sopaikensis*, *A. bubonis*, *A. multimaculatus*, *A. koreanus*, *A. dageletensis*, *A. heteropodus*, *A. odaesanensis*, *Pontoscolex* sp., *Pheretima* sp. 1, *Dendropheretima banahawensis* 등 이었다. 이 그룹에 속하는 종들은 염기서열에 뚜렷한 차이가 없어 비교할 수 없었다. 이들의 대부분은 *Amynthas* 속에 속하는 종류들로써 우리나라 삼림에서 채집되는 종류들이다. 또한 *A. odaesanensis*와 또 다른 clade를 형성하는 *Pontoscolex* sp., *Pheretima* sp. 1, *Dendropheretima banahawensis* 등은 필리핀의 삼림에서 채집되는데, 국내에서는 아직 보고되지 않은 속의 종들이다. 이는 본 연구에 사용된 ITS 유전자로 지렁이 분류군에서 처음 속간 계통을 구별하는데 사용한 점에 의의가 있다. 하지만 본 연구 결과 이외의 다른 유전자 부위, 즉 cyto b 또는 COI 등을 사용하여 분석하면, 본 ITS 유전자와 더불어서 지렁이 분류군에 있어서 과 이하의 그룹을 분석하는데 더욱 효율적일 수도 있다. 이 복합군에 속하는 종들은 형태적으로 뚜렷한 구분을 보이는 종들이다. 특히 *Amynthas*에 속하는 10종은 우리나라 전형적인 *Amynthas* 특징을 보여주는 종들이다. *Amynthas dageletensis*와 *Amynthas koreanus*는 다른 종들보다는 더욱 유전적으로 밀접하게 나타나고 있다. *A. dageletensis*는 현재 우리나라 울릉도에만 분포하는 것으로 보고된 종이고, *A. koreanus*는 1936년 처음 보고된 이래 우리나라 전국의 삼림에서 가장 많이 채집되고 있는 종 가운데 하나이다. *A. dageletensis* 종의 가장 큰 특징은 숫생식구 (male pore)가 없다는 점에서 한국의 다른 종들과 뚜렷하게 구분되는 종이다. 물론 저장낭 (spermathecae)도 나타나지 않는다. *A. koreanus* 종은 형태적으로 변이가 매우 심한 종으로 저장낭공 (spermathecal pore)의 위치

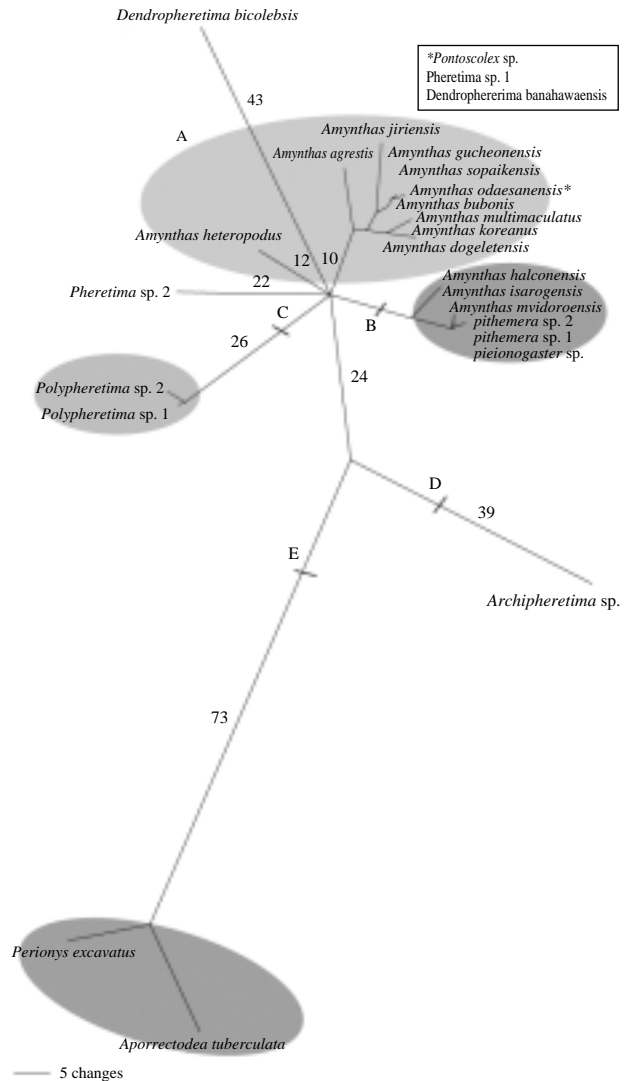


Fig. 1. Maximum parsimonious tree inferred from 26 ITS nucleotide sequences showing the phylogenetic position of *Amynthas* species within the *Pheretima*-complex using PAUP*. The numbers above the branches are bootstrap proportions obtained with 1,000 bootstrap replicates.

가 5/6, 6/7 또는 5/6 이나 6/7에 나타나기도 하고 전혀 없는 경우도 있다. 또한 male pore가 있는 경우가 많지만 간혹 나타나지 않는 경우도 있는데, 없는 경우는 지렁이 종류 가운데 자연계에서 단성생식을 하는 종류로 추정하고 있다. 본 분석에서 두 종이 밀접한 유전적 관계를 보이는 것이 이러한 형태적 유사성에 근거하는 것으로 추정된다. A그룹에 있어서 원시형으로 보이는 *A. agrestis*와 *A. heteropodus*는 각각 3쌍과 4쌍의 저장낭을 가지고 있다. *Amynthas* 속의 다른 종들은 2쌍의 저장낭을 가지고 있으나 이들 종은 저장낭이 많은 쪽에서 적은 방향으로 진화를 하고 있다는 Thai (1983)의 가설과

도 일치하는 경향을 보인다. 앞으로 mtDNA의 다른 유전자 부위를 비교하여 금번 연구에서 나타난 부분을 확인할 필요성이 있다.

두 번째 그룹은 *A. halconensis*, *A. isarogensis*, *A. mindoroensis*, *Pithemera* sp. 2, *Pithmera* sp. 1., *Pleionogaster* sp. 등의 종들이 하나의 clade로 묶이는 것을 볼 수 있다. 이 그룹 종들의 특징은 국내에서는 전혀 채집되지 않고, 필리핀에서 채집된 종이였다. 특히 국내에서 채집되는 *Amyntas* 속의 종과는 달리 필리핀에서 채집된 3종의 *Amyntas* 종은 이 두 번째 그룹에 모두 속하는 것으로 확인되었다. 이는 동일한 속이라 하더라도 지리적 차이에 따른 환경의 영향을 받았음을 알 수 있다. 즉 형태적 분화가 이루어졌다고 하더라도 유전적으로는 동질성을 나타내고 있음을 알 수 있다. *Pleionogaster* 속 또한 필리핀에서 채집되었으나 국내에서는 아직 기록되지 않은 속이다.

Polypheretima sp. 1 및 *Polypheretima* sp. 2 종은 단계통을 형성하는데, 이 *Polypheretima* 속에 속하는 2종은 다른 속에 속하는 종들에 비하여 훨씬 뚜렷하게 나누어지는 것을 확인할 수가 있다. 이 *Polypheretima* 속은 *Meta-pheretima* 속에 속하는 종들 중 일부 다른 형태적 특징에 의해서 Easton (1979)에 의해서 새로운 속으로 나누어진 바 있다. 하지만 이러한 결과로 *Polypheretima*와 *Archipheretima* 속의 유연관계를 밝힐 수는 없다. 본 ITS 유전자에 의한 속내, 종간 분석에 있어서 가장 유효하게 분지도를 만들 수 있는 그룹으로 생각한다.

마지막 그룹은 *Archipheretima* sp.와 *Dendropheretima bicoloris*이다. 이 *Archipheretima* 속에 속하는 종의 가장 큰 특징은 *Pheretima*-complex에 속하는 다른 종들과는 달리 환대(clitellum)가 제13마디에서부터 시작된다는 것이다. *Archipheretima* sp.가 다른 종들과는 다르게 분지된 것은 이와 같은 형태적 특징의 영향을 받았음을 추정할 수 있다. 즉 분석에 사용된 다른 종들은 환대가 제14마디에서 시작하여 16마디에서 끝나는 전형적인 지렁이과 종류의 특징을 보여주고 있다. 차후, 다른 유전자, 즉 mtDNA 유전자 분석을 통하여 이러한 내용을 지지해주는 결과가 도출된다면 형태적 형질에 있어서 환대의 중요성, 또한 지렁이과 내에서 이 속에 속하는 종들의 계통분류학적 위치를 재 논의하는 중요한 단서를 확보할 수 있을 것이다. *Archipheretima* sp. 종과 더불어서 다르게 분지되는 모습을 보이는 중, *Dendropheretima bicoloris*는 주 분석 대상으로 삼고 있는 *Pheretima*-complex 그룹 중에서 가장 최근에 새롭게 만들어진 그룹으로 이 그룹에는 2종이 보고되어 있다 (James 2005a). 이중 역시 본 논문의 제2저자인 James에 의해서 필리핀

의 삼림에서 채집된 종으로 아직 이 그룹에 대한 분류, 생태적인 논의는 거의 없는 실정이다. 본 실험에서 이와 같이 다르게 분지된 이유는 이 종이 속한 그룹의 분류, 생태학적인 특징과 연관이 있으리라 추측된다.

Outgroup으로 사용한 *Perionyx excavatus*와 같이 계통도에 있어 긴 branch를 나타내는 *Aporrectodea tuberculata*는 분석에 사용된 다른 24종과는 달리 서식지 특성이 사람과 매우 밀접하다는 점이 있다. MP는 73%, NJ는 75%, QP는 88%의 bootstrap value를 보여준다. 이들 종의 서식지 특이성은 바로 농생태계에 있다. 특히 *Perionyx excavatus* (팥딱이지렁이) 종은 양식농가의 사용장에 붉은줄지렁이와 더불어 널리 사육되고 있는 종이다. 또한 이 종은 생식기의 형태가 좌우 양옆의 대칭형으로 나타나는 그룹의 종들과는 달리 복부중앙으로 함께 나타나는 다른 모습을 보인다. 이러한 특징은 오히려 빈번하게 출현하는 *Pheretima*에 속하는 종들과 유사한 특징이다. 즉 이 그룹은 서식지 특이성이 자연숲이 아닌, 사람과 밀접한 곳에서 생활하고 있다는 점이다.

고 찰

동물계의 종 식별용 유전자로는 rDNA ITS와 CO1, 그리고 cyto b 유전자 부위가 가장 널리 이용되고 있다. 이들 유전자는 분류군에 따라 상호 보완적인 관계를 보여주고 있다. 예를 들면 ITS 유전자보다 CO1이 훨씬 용이한 경우가 있고(모기를 제외한 3배엽성 동물), 반대로 CO1보다 ITS가 나은 경우도 있다(2배엽성 동물과 모기). 본 연구에서는 ITS 유전자에 대한 실험을 진행하여 지렁이과 분류군에 대한 계통을 추적하여 보았다. 하지만 본 실험에서도 나타난 바와 같이 속 이하의 그룹을 계통분류 하는데 있어서는 한 종류의 유전자 부위가 아니라, 다른 유전자 부위를 같이 분석한다면 더욱 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다. 즉, 차후 이 ITS와 더불어서, CO1과 cyto b에 대한 실험을 진행하여 이들 유전자에 대한 지렁이, 특히 국내에서 많이 서식하고 있는 지렁이과 그룹, 종에 대한 유연관계를 확인할 수 있을 것이다. 부가적으로 모델테스트 프로그램을 통해서 GTR+I+G 모델이 선택되었고, 선택된 모델을 Bayesian 프로그램에 적용하여 계통분석 결과를 얻었다. 같은 *Perionyx excavatus* 종을 outgroup으로 하여 1,000,000번 분석한 결과, PAUP로 분석된 계통도와 다른 점을 발견하지 못했는데 이는 PAUP를 통해서 분석한 결과를 강하게 뒷받침 해주고 있다.

적 요

지렁이과 (family Megascolecidae) 왕지렁이속 (genus *Amyntas*) 그룹을 rDNA ITS 유전자를 이용하여 계통 유연관계를 알아보고자 하였다. 2과 10속에서 26종의 DNA 염기서열을 이용하여 중간 계통적 유연관계를 MP (Maximum Parsimony), NJ (Neighbor Joining), QP (Quartet Puzzling)로 계통도를 작성하였다. 염기서열이 확보된 Megascolecidae (지렁이과)의 국내외 26종에 대한 계통 분석은 위 3개의 알고리즘 모두 동일한 5개의 그룹으로 나누는 것을 확인하였다. 또한 *Amyntas* 속은 크게 한국산 그룹과 필리핀산 그룹으로 구분되었다. 첫 번째 그룹, *Amyntas jirensis*, *A. agrestis*, *A. gucheonensis*, *A. sopai-kensis*, *A. bubonis*, *A. multimaculatus*, *A. koreanus*, *A. dageletensis*, *A. heteropodus*, *A. odaesanensis*, *Pontoscolex* sp., *Pheretima* sp. 1와 다른 그룹, *Dendropheretima banahawensis*, *Amyntas halconensis*, *A. isarogensis*, *A. mindroensis*, *Pithemera* sp. 2, *Pithemera* sp. 1, and *Pleionogaster* sp.이다. 이는 ITS 유전자가 속간의 차이를 보여주는 것보다 동일한 속이라 하더라도 지리적 차이에 따른 환경의 영향을 받았음을 알 수 있다. 즉 형태적 분화가 이루어졌다고 하더라도 유전적으로는 동질성을 나타내고 있음을 알 수 있다. 형태적 특징에 의한 명백한 차이는 구분되지 않았다.

사 사

본 연구는 2004년도 한국과학재단 기초과학연구 (KRF-2004-015-C00516) 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Anderson TJ and RD Adlard. 1994. Nucleotide acid sequence of a rDNA internal transcribed spacer supports synonymy of *Saccostrea commercialis* and *S. glomerata*. J. Moll. Stud. 60:196-197.
- Baldwin BG, MJ Sanderson, JM Porter, MF Wojciechowski, CS Campbell and MJ Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Mo. Bot. Gard. 82:247-277.
- Banks MA, D Hedgecock and C Waters. 1993. Discrimination between closely related Pacific oyster spp. (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 2:129-136.
- Chang CH, SC Chuang, YR Chen and JH Chen. 2005. NADH dehydrogenase subunit 1 gene of the earthworm *Amyntas gracilis* (Kinberg, 1867) (Oligochaeta: Megascolecidae), with the discussion on inferring the megascolecid phylogeny using DNA sequences. Taiwania. 50:71-79.
- Chang CH, YH Lin, IH Chen, SC Chuang and JH Chen. 2007. Taxonomic re-evaluation of the Taiwanese montane earthworm *Amyntas wulinensis* Tsai, Shen & Tsai, 2001 (Oligochaeta: Megascolecidae): Polytypic species or species complex?. Organ. Diversity Evol. 25062:1-10.
- Easton EG. 1979. *Pheretima* group (Megascolecidae: Oligochaeta): *Archipheretima*, *Metapheretima*, *Planapheretima*, *Pleionogaster* and *Polypheretima*. Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.). 35:1-126.
- Edwards CA. 1988. Breakdown of animal, vegetable, and industrial organic wastes by earthworms. Agric. Ecosyst. Environ. 24:21-31.
- Hong Y and SW James. 2001a. New species of Korean *Amyntas* (Oligochaeta, Megascolecidae) with two pairs of spermathecae. Rev. Suisse Zool. 108:65-93.
- Hong Y and SW James. 2001b. Five new earthworms of the genus *Amyntas* Kinberg (Megascolecidae) with four pairs of spermathecae. Zool. Stud. 40:269-275.
- Hong Y, TH Kim and YE Na. 2001. Identity of two earthworms used in vermiculture and vermicomposting in Korea: *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus*. Korean J. Syst. Zool. 17:185-190.
- Hong Y. 2002. New earthworms of the genus *Drawida* Michaelsen, 1900 (Oligochaeta: Moniligastridae) from Korea. Rev. Suisse Zool. 109:475-482.
- Hong Y and TH Kim. 2002a. Three new earthworms of the genus *Amyntas* (Megascolecidae) from Mt. Gyeryong, Korea. Rev. Suisse Zool. 109:483-489.
- Hong Y and TH Kim. 2002b. Four new earthworms of the genus *Amyntas* (Oligochaeta: Megascolecidae) from Korea. Korean J. Biol. Sci. 6:195-199.
- Hong Y and TH Kim. 2004. New species of *Amyntas* Kinberg, 1867 from the Philippines (Oligochaeta: Megascolecidae). Rev. Suisse Zool. 111:729-741.
- Hong Y and TH Kim. 2005. The earthworm fauna from Ulleungdo Island, Korea with one new species of the genus *Amyntas* (Oligochaeta: Megascolecidae). Korean J. Syst. Zool. 21:129-136.
- Jameieson BGM, S Tiller, A Tiller, J-L Justine, E Ling, S James, K McDonald and AF Hugall. 2002. Phylogeny of the Megascolecidae (Oligochaeta, Annelida): Combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. Zoosystema 24: 707-734.
- James SW. 2004. New species of *Amyntas*, *Pheretima* and

- Pleionogaster* (Clitellata: Megascolecidae) of the Mt. Kitanglad range, Mindanao Island, Philippines. Raf. Bull. Zool. 52:289-313.
- James SW. 2005a. New genera and species of pheretimoid earthworms (Clitellata: Megascolecidae) from southern Luzon, Philippines. Syst. and Biodiver. 2:271-279.
- James SW. 2005b. Preliminary molecular phylogeny in the *Pheretima* group of genera (Crassiclitellata: Megascolecidae) using Bayesian analysis. Advances in Earthworm Taxonomy II (Annelida: Oligochaeta). pp. 129-142.
- Kobayashi S. 1936. Earthworms from Koryo, Korea. Sci. Rep. Tohoku Univ. 11:139-184.
- Kobayashi S. 1938. Earthworms of Korea I. Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol. 13:89-170.
- Reynolds JW and DG Cook. 1976. Nomenclatura Oligochaetologica, a catalogue of names, descriptions and type specimens of the Oligochaeta. Fredericton: Univ. of New Brunswick. 217pp.
- Sims RW and EG Easton. 1972. A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* auct. (Megascolecidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the earthworms collected by the Royal Society North Borneo Expedition. Biol. J. Linn. Soc. 4:169-268.
- Song MJ and KY Paik. 1973. Earthworms from Mt. Sopaik, Korea. Korean J. Zool. 16:5-12.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony and other method. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland.
- Thai TB, 1983. Evolutionary changes in the set of seminal receptacles and development of the way of sperm transfer in *Pheretima* (Oligochaeta: Megascolecidae). Zool. Zurn. 62:1457-1461.
- Tompson JD, DG Higgins and TJ Gibson. 1997. Clustal W: Improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Res. 22:4673-4680.
- Yang YW, PF Tseng, PY Tai and CJ Chang. 1998. Phylogenetic position of *Raphanus* in relation to *Brassica* species based on 5S rRNA spacer sequence data. Bot. Bull. Acad. Sin. 39:153-160.

Manuscript Received: October 17, 2007

Revision Accepted: November 12, 2007

Responsible Editor: Kap Joo Park